

Patent document published in the Russian Federation in accordance with the Patent Law of the Russian Federation No. 154-FZ dated July 19, 1996.

(110) Numbers of the publication
(130) Kinds of the document C1
(140) Dates of the publication 1998.04.20
(190) Countries of the publication RU
(210) Registration numbers of the application 97
(220) Dates of application 1997.06.24
(460) Dates of the publication of the formula of the invention 19
(516) Numbers of edition МПК 6
(511) Basic indexes МПК A61K38/21
(511) Basic indexes МПК C12N7/00
The name PREPARATION "LOCFERON" FOR TREATMENT
AND PROPHYLAXIS OF VIRAL DISEASES AND A METHOD OF ITS PREPARING
(711) Names of the applicant Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
" Svet Soft Bio "
(721) Names of the inventor Jakushevich Ju. E.
(721) Names of the inventor Ilidzhev A.K.
(721) Names of the inventor Udotov Ju. M.
(721) Names of the inventor Popov V.F.
(721) Names of the inventor Naumova N.N.
(731) Names патентообладателя Obshchestvo s ogranichennoj
otvetstvennost'ju " Svet Soft Bio "
№2108804. Abstract

FIELD: biotechnology, medicine. : invention relates to curative-prophylaxis preparation based on human leukocyte interferon. Preparation "Locferon" has interferon synthesized by donor blood leukocytes induced by virus strain-inducer of virus parainfluenza-1 Sendai GKV N 2339. Preparation is concentrated and purified by ultrafiltration. Preparation has 8000 IU antiviral activity in one ampoule - interferon, cellular mediators of molecular mass 10-100 kDa, ovalbumin - less 1 ng/ml, sodium chloride and stabilizing agent. "Locferon" inhibits multiplication of broad spectrum viruses - herpes viruses, adenoviruses, enteroviruses and others. Preparation blocks intracellular replication of viral particles and activates protective cellular response reactions. EFFECT: enhanced effectiveness of preparation. 3 cl



(19) RU (11) 2108804 (13) C1

(51) 6 A 61 K 38/21, C 12 N 7/00

Комитет Российской Федерации
по патентам и товарным знакам

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Российской Федерации

1

(21) 97109525/13 (22) 24.06.97
(46) 20.04.98 Бюл. № 11
(72) Якушевич Ю.Е., Илджев А.К., Удотов Ю.М., Попов В.Ф., Наумова Н.Н.
(71) (73) Общество с ограниченной ответственностью "Свет Софт Био"
(56) 1. RU, патент, 2033180, кл. А 61 К 38/21, 1995. 2. SU, авторское свидетельство 297296, кл. А 61 К 38/21, 1977.
(54) ПРЕПАРАТ "ЛОКФЕРОН" ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ
(57) Изобретение относится к биотехнологии и медицине и касается лечебно-профилактического препарата на основе человеческого лейкоцитарного интерферона. Препарат "Локферон" содержит интерферон, синтезированный лейкоцитами донор-

2

ской крови под воздействием вируса индуктора-штамма вируса парагриппа 1 Сейдай ГKB N 2339. Препарат сконцентрирован и очищен микро- и ультрафильтрацией. Препарат содержит не менее 8000 МЕ в одной ампуле противовирусной активности - интерферона м клеточные медиаторы с м.к. 10 - 100 кД, овальбумин - менее 1 нг/мл, хлорид натрия и стабилизатор. Препарат свободен от антибиотиков и гепарина. Локферон подавляет размножение широкого спектра вирусов; герпесвирусов, аденовирусов, энтеровирусов и др. Противовирусное действие препарата заключается в том, что он блокирует внутриклеточную репликацию вирусных частиц, активируя в клетках защитные реакции. 2 с.з.п.ф.-лы, 1 з.п.ф.-лы.

RU
2108804
C1



Изобретение относится к биотехнологии и медицине, в частности к производству лечебно-профилактических препаратов на основе лейкоцитарного интерферона.

Как известно, лейкоцитарный интерферон или альфа-интерферон, секретируемый лейкоцитами в ответ на воздействие индуктора, является одним из важнейших факторов защиты организма от вирусных инфекций и ряда других заболеваний.

Установлено, что лейкоциты продуцируют в комплексе с белком альфа-интерфероном также другие биологические активные белки с медиаторной активностью, например лимфокины и монокины, и что особенно важно - весь этот комплекс активирует иммунную систему организма. В связи с этим современное понятие "интерферон" охватывает комплекс биологически активных белков, секретируемых лейкоцитами на воздействие индукторов различной природы, а степень активности интерферона зависит от наличия в его составе клеточных медиаторов, сохраненных в процессе очистки препарата.

Известен препарат "Лейкинферон" - очищенный человеческий лейкоцитарный интерферон (ЧЛИ) с сохранением биологически активных белков, содержащий в одной ампуле 10000 МЕ противовирусной активности альфа-интерферона, интерлейкин 1, фактор некроза опухолей, макрофагангибирующий фактор и лейкоцитингибирующий фактор [1].

Лейкинферон является высокоактивным препаратом, но применим только в виде инъекций, что ограничивает его использование в широкой практике.

Известен способ получения препарата Лейкинферона, предусматривающий синтез интерферона в культуре лейкоцитов донорской крови под действием индуктора - вируса болезни Ньюкаста и последующую инактивацию вируса и очистку ЧЛИ от аллантоисных белков методом негативной иммуносорбции, а затем гельфильтрацией на колонке с сефадексом G 25 для удаления низкомолекулярной фракции с молекулярной массой (м.м.) до 10 кД.

В окончательно очищенную фракцию добавляют фосфатный буфер до конечной концентрации 0,01 М, хлорид натрия - до конечной концентрации 0,9% и стабилизатор - маннит [2].

Однако стадия очистки целевого продукта от примесей трудоемка, продолжительна и неэффективна в крупномасштабном производстве.

Известен также препарат "Интерлок" для лечения и профилактики вирусных заболеваний, содержащий альфа-интерферон и биологически активные белки, образующиеся при активации лейкоцитов и имеющие м.м. в диапазоне 10-30 кД. Наполнителем и стабилизатором препарата "Интерлок" служит лактоза. Одна ампула препарата содержит не менее 5000 МЕ человеческого альфа-интерферона [3].

Недостатком препарата "Интерлок" является невысокая эффективность вследствие потери при очистке высокомолекулярных биологически активных белков, синтезируемых лейкоцитами на стадии биосинтеза интерферона.

Известен способ получения препарата Интерлока, включающий инкубацию культуры лейкоцитов донорской крови с индуктором - вирусом болезни Ньюкаста, отделение культуральной жидкости, содержащей интерферон, от лейкоцитов, очистку ЧЛИ путем осаждения его сульфатом аммония с последующим растворением осадка в 2-8 М мочеvine и затем гельфильтрацией на колонке с гелем Акрилекс П-60 для удаления низкомолекулярной фракции до 10 кД. В полученную фракцию добавляют фосфатный буфер до конечной концентрации 0,01 М и стабилизатор лактозу. Полученная лекарственная форма разливается в ампулы по 2 мл и лиофильно сушится [3].

Однако известный способ получения ЧЛИ не позволяет получить препарат с широким спектром биологически активных белков.

Кроме того, в процессе очистки применяют токсичные вещества, в том числе мочеvinу, что сказывается на реактогенности конечной формы препарата.

Препарат "Интерлок" и способ его получения принят в качестве ближайшего аналога.

Технической задачей изобретения является получение препарата с высокой противовирусной активностью, очищенного от балластных белков и алергизирующих примесей, и разработка технологического способа его получения, приемлемого для промышленного производства.

Технический результат изобретения заключается в создании высокоактивного противовирусного препарата "Локферон", содержащего в своем составе альфа-интерферон в комплексе с клеточными медиаторами, свободного от алергизирующих компонентов, не реактогенного и хорошей толерантностью конечной формы, а также в разработке

высокопроизводительной и простой технологии его получения.

Сущность изобретения заключается в следующем.

Препарат для лечения и профилактики вирусных заболеваний Локферон содержит человеческий лейкоцитарный интерферон, синтезированный лейкоцитами крови под воздействием индуктора - штамма вируса парагриппа 1 Сендай ГKB N 2339, сконцентрированный и очищенный микро- и ультрафильтрацией; содержащий не менее 8000 ME в одной ампуле противовирусной активности альфа-интерферона и клеточные медиаторы с м.м. 10-100 кД, овальбумин - не менее 1 кг/мл, свободный от антибиотиков и гепарина и содержащий хлорид натрия - до конечной концентрации 0,9 мас.%, и стабилизатор, например, лактозу или поливинилпирролидон или маннит.

Способ получения препарата "Локферон" для лечения и профилактики вирусных заболеваний на основе ЧЛИ, отличается тем, что для индукции интерферона используют штамм вируса парагриппа 1 Сендай ГKB N 2339 и после кислотной инактивации вируса-индуктора полуфабрикат интерферона без изменения pH (pH 2,0-2,4) подвергают трехстадийной очистке: сначала микрофильтрацией на мембранах с порогом отсеивания 0,2 мкм, далее ультра- и диафильтрацией на мембранах с пределом отсеивания 5 кД, а затем - ультрафильтрацией на мембранах с пределом отсеивания 100 кД. При этом на второй стадии очистки подвергают фильтрат после микрофильтрации, а на третьей стадии - концентрат, полученный с предыдущей стадии.

После окончания процесса очистки в полученный фильтрат, представляющий собой очищенный ЧЛИ, добавляют хлорид натрия до конечной концентрации 0,9 мас.%, и стабилизатор, например лактозу, поливинилпирролидон, маннит. Раствор препарата стерильно фильтруют, подводят pH до 7,0-7,2, разливают во флаконы и лиофильно высушивают.

Согласно изобретению для индукции интерферогенеза используют штамм вируса парагриппа 1 Сендай ГKB N 2339, что приводит к существенному уменьшению количества аллантоисных белков, в частности, овальбумина в целевом продукте и при этом не требуется проведение дополнительных операций по очистке препарата от овальбумина.

Штамм вируса парагриппа 1 Сендай ГKB N 2339 селекционирован в отделении интерферонов предприятия "Биомед" им.Меч-

никова, типирован со штаммом вируса парагриппа 1 Сендай ГKB N 326 и отличается от него титром инфекционной активности. Штамм депонирован в Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Ивановского и имеет регистрационный номер 2339.

Синтезированный и очищенный с использованием мембранных технологий препарат интерферона "Локферон" сохраняет в своем составе широкий спектр иммуномодуляторов с м.м. 10-100 кД, вырабатываемых человеческими лейкоцитами в процессе биосинтеза, имеет высокую противовирусную активность и, в отличие от других известных препаратов, обладает буферными свойствами, поэтому для сохранения стабильности не требует добавления буферных растворов, что снижает токсичность готовой формы.

Кроме того, производство "Локферона" проводится без применения антибиотиков, гепарина, мочевины, что также приводит к снижению токсичности и отсутствию побочных эффектов и хорошей толерантности конечной формы.

Пример 1. Выделенные из донорской крови лейкоциты суспендируют в среде 199 с соответствующими добавками и вносят индуктор - штамм вируса парагриппа 1 Сендай ГKB N 2339 в количестве 8000 ГАЕ/мл. Инкубируют при 37°C в течение 18 ч. Далее удаляют лейкоциты центрифугированием, добавляют к супернатанту 20%-ный раствор соляной кислоты до pH 2,0-2,4 и выдерживают не менее 7 сут.

После кислотной инактивации полуфабрикат интерферона подвергают трехстадийной очистке с финальной стерилизующей фильтрацией. Всю очистку интерферона, включая стерилизующую фильтрацию, проводят в зоне pH от 2,0 до 2,4.

На первой стадии очистки полуфабрикат интерферона осветляют микрофильтрацией на мембранах с порогом отсеивания 0,2 мкм.

На второй стадии осветленный полуфабрикат концентрируют в 5-10 раз на ультрафильтрационных мембранах с пределом отсеивания 5 кД и далее подвергают диафильтрации при постоянном объеме с введением очищенной дистиллированной воды в 10-кратном объеме концентрата.

На третьей стадии очистки частично очищенный, свободный от низкомолекулярных примесей и сконцентрированный полуфабрикат (концентрат) интерферона подвергают диафильтрации при постоянном объеме на ультрафильтрационных мембранах с пределом отсеивания 100 кД с введением очищенной дистиллированной воды. Очищен-

ний при этом от высокомолекулярных примесей интерферон (фильтрат) разводят в 2-4 раза.

После окончания процесса очистки в фильтрат, представляющий собой очищенный интерферон, добавляют хлорид натрия до концентрации 0,9% и лактозу до концентрации 1 мг/мл и стерильно фильтруют.

Полученную лекарственную форму разливают во флаконы по 2 мл и лиофильно сушат.

Пример 2. Полученный по примеру 1 препарат "Локферон" в виде глазных капель применяют для лечения офтальмологических инфекционных болезней, таких как герпетический кератит, вызываемый вирусом простого герпеса (везикулярный, звездчатый, точечный, древовидный, картообразный); герпетический кератит стромальный с изъязвлением и без изъязвления роговицы; герпетическая язва роговицы; герпетический кератоувесит с изъязвлением и без изъязвления роговицы; герпетический увесит; герпетический конъюнктивит; аденовирусный конъюнктивит; эпидемический кератоконъюнктивит; геморрагический кератоконъюнктивит.

Эффективность препарата наиболее высока в начальной стадии заболевания.

В острой стадии заболевания Локферон применяют в виде инсталляций в глаз по 1-2 капли 8 раз в день в сочетании с симптоматической терапией. По мере купирования воспалительного процесса число инсталляций уменьшают до 2-3 раз в день. Курс лечения продолжают до исчезновения симптомов заболевания.

Препарат не имеет возрастных ограничений, противопоказаний к применению не имеет.

При введении препарата Локферон не отмечено заметных реакций как местного, так и общего характера. Сенсибилизации при длительном многократном введении не выявлено.

Частота достижения выраженного терапевтического эффекта у больных с тяжелыми формами герпетических поражений глаз при применении Локферона была выше в 1,5-2 раза, чем при лечении Интерлоком.

Пример 3. Полученный по примеру 1 препарат "Локферон" в виде примочек применяют для лечения простого рецидивирующего герпеса в комплексе с витаминами группы В, Е и С. Курс лечения составил 5 дней.

Клиническая симптоматика и субъективные ощущения исчезли на 4 день лечения. После проведенного лечения отмечена стойкая ремиссия в течение 5 мес.

Пример 4. Полученный по примеру 1 препарат "Локферон" в виде капель применяют для лечения и профилактики острых респираторных заболеваний и гриппа.

Для профилактики респираторных заболеваний препарат вводят в носовые ходы один раз в день в течение эпидемического периода, а для лечения - четырех раз в день в течение 2-5 дней.

ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

1. RU, патент N 2033180, кл. А 61 К 38/21, 1995.

2. RU, патент N 297296, кл. А 61 К 38/21, 1977.

3. И 122.015-84. "Инструкция по технологии изготовления и контролю очищенного лейкоцитарного интерферона" от 29.12.84 (на основании приказа МЗ от 31.08.83).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Препарат для лечения и профилактики вирусных заболеваний на основе человеческого лейкоцитарного интерферона, отличающийся тем, что он содержит интерферон, синтезированный лейкоцитами донорской крови под воздействием индуктора - штамма вируса парагриппа 1 Сендай ГКВ N 2339, сконцентрированный и очищенный микро- и ультрафильтрацией, содержащий не менее 8000 МЕ в одной ампуле противовирусной активности α -интерферона и клеточные медиаторы с м.м. 10 - 100 кД, овальбумин - менее 1 нг/мл, свободный от антибиотиков и гепарина, и содержащий хлорид натрия - до конечной концентрации 0,9 мас.% и стабилизатор.

2. Препарат по п.1, отличающийся тем, что стабилизатор содержит лактозу, или поливинилпирролидон, или маннит.

3. Способ получения препарата для лечения и профилактики вирусных заболеваний, включающий инкубацию культуры лейкоцитов донорской крови с вирусом - индуктором, отделение интерферонсодержащей культуральной жидкости, кислотную инактивацию вируса - индуктора, очистку полученного интерферона с последующим добавлением стабилизатора и хлорида натрия и лиофильным высушиванием, отличающийся тем, что в качестве индуктора используют штамм вируса парагриппа 1 Сендай ГКВ N 2339, очистку проводят при

pH 2,0 - 2,4, сначала микрофльтрацией на мембранах с порогом отсека 0,2 мкг, далее фильтрат подвергают ультра- и диалитрацией на мембранах с пределом отсека 5 кД, затем концентрат после диалитрации снова диалитруют на ультрафилтратационных мембранах с пред-

елом отсека 100 кД, и в полученный фильтрат, представляющий собой очищенный интерферон, добавляют хлорид натрия до конечной концентрации 0,9 мас.% и стабилизатор.

Заказ

Подписное

ВНИИПИ, Рег. ЛР № 040720

113834, ГСП, Москва, Раушская наб., 4/5

121873, Москва, Бережковская наб., 24 стр. 2.
Производственное предприятие «Патент»